

参考文献

1 沈福英,徐笑,陈颂英. 第一产程综合干预促进产程进展 300 例临床观察[J]. 海南医学院学报,2009,(1):63-64,66

2 孙蔚,陈维萍,王笑芳. 水针分娩镇痛的临床效果[J]. 齐鲁医学杂志,2004,(3):251-252

3 谭冠先. 疼痛诊疗学[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:4-10

4 廖碧珍,周勤. 穴位按摩应用于分娩镇痛的研究[J]. 重庆医科大学学报,2003,(4):541-543

5 北京按摩医院. 中国按摩全书[M]. 北京:华夏出版社,1993:160

6 乔治·阿德尔曼. 神经科学百科全书[M]. 上海:上海科学技术出版社,1992:310

7 Shellenberger MK, Gordon JH. A rapid, simplified procedure for simultaneous assay of norepinephrine, dopamine and 5-hydroxytryptamine from discrete brain areas. Anal Biochem, 1971, 39:356

8 孙德玉. 家兔黑质内注射多巴胺对电针镇痛作用的影响[J]. 针刺研究,1985,(1):30-31

(收稿:2009-11-05)

(修回:2009-11-17)

干燥综合征患者细胞因子途径、Jak - Stat 信号途径以及神经激活受体配体途径相关基因表达的初步分析

王 芳 程永静 黄慈波 陈颖娟 赖 蓓

摘要 目的 分析干燥综合征患者的细胞因子途径、Jak - Stat 信号途径及神经激活受体配体途径相关基因的表达情况并分析意义。**方法** 取 3 例干燥综合征患者及 3 例健康对照者的外周血单个核细胞,提取总 RNA 反转录至 cDNA 后,分别用 Cy5 及 Cy3 荧光标记干燥综合征组及对照组的 cDNA 样品,与寡核苷酸基因芯片杂交。采用图像分析软件提取芯片图像数据,以 Cy5/ Cy3 的比值(SAM 软件)寻找差异表达基因,并进一步用分子功能注释软件(MAS 系统)进行处理。**结果** 干燥综合征患者细胞因子途径、Jak - Stat 信号途径及神经激活受体配体作用途径相关基因的差异表达有统计学意义($P < 0.05$)。以上途径中基因 PF4、GZMA 表达下调,基因 IL - 2RA、IL - 10 表达上调。**结论** 干燥综合征的发病可能是多基因调控异常所致,细胞因子途径、Jak - Stat 信号途径及神经激活受体配体途径的差异表达基因可能为研究该病的发病机制及新的治疗靶向提供了重要依据。

关键词 干燥综合征 基因芯片 细胞因子途径 Jak - Stat 信号途径 神经激活受体配体途径

Gene Expression of Cytokine Pathway, Jak - Stat Signal Pathway and Neuroactive Ligand - receptor Pathway in Patients with Primary Sjögren's Syndrome. Wang Fang, Cheng Yongjing, Huang Cibo, Chen Yingjuan, Lai Bei. Department of Rheumatology and Immunology, Beijing Hospital, Beijing 100730, China

Abstract Objective This study is to investigate cytokine pathway, Jak - Stat signal pathway, neuroactive ligand - receptor pathway gene expression pattern of peripheral blood mononuclear cell (PBMC) of primary sjögren syndrome patients. **Methods** The PBMC sample of 3 patients with sjögren syndrome and 3 healthy volunteers with consistent age were collected. The total RNAs was extracted from the PBMC samples, and reverse transcribed in vitro transcription (IVT), labeled with Cy5/Cy3 and hybridized on the gene chips. After scanning and data extraction with LuxScan 3.0, differentially expressed genes were analyzed with SAM method. The online tool of molecule analysis system (MAS) was used for biological knowledge mining. **Results** Statistical difference was calculated between the patient and control group in the following three pathways: cytokine pathway, Jak - Stat signal pathway, neuroactive ligand - receptor pathway. Among these, genes of IL - 2RA, IL - 10 were up - regulated and genes of PF4, GZMA were down - regulated. **Conclusion** Understanding of differently expressed genes should help us disclose the potential molecular mechanism underlying the development process of pathogenesis of primary Sjögren's syndrome. And the research may provide new target therapy for SS.

Key words Sjögren's syndrome ; Microarray ; Cytokine pathway ; Jak - Stat signal pathway ; Neuroactive ligand - receptor pathway

基金项目:北京医院青年基金(BJ - 2005 - 68)
作者单位:100730 卫生部北京医院风湿免疫科
通讯作者:黄慈波,电子信箱: huangcibo1208@sina.com

干燥综合征(Sjögren's syndrome, SS)是一病因不明的慢性炎症性疾病^[1],临床上以口干、眼干为主要临床表现,其病理特征为泪腺、唾液腺中单个核细胞浸润聚集灶,从而导致外分泌腺结构破坏、功能失常。有研究发现外分泌腺中的Th1细胞主要分泌细胞因子IL-2、IL-10、IFN- γ ^[2];还有人认为SS发病与EBV、HIV、HLTV-1、HCV等病毒感染有关。但这些学说都不能完全解释SS的发病机制。

本研究采用基因芯片法检测干燥综合征患者的差异表达基因,从基因途径角度重新认识干燥综合征的发病机制,寻找新的治疗靶点。

资料与方法

1. 研究对象的选择和细胞RNA的提取:选择3例初发未正规治疗的女性原发性干燥综合征患者,诊断标准遵从2002年SS国际分类诊断标准。3例SS患者,汉族,年龄36~46岁。均行唇腺活检,病理提示淋巴细胞浸润灶为1~4个/4平方毫米(每个淋巴细胞灶的淋巴细胞数目超过50个)。同时选择3例同年龄组的女性健康对照者,血清ANA、ENA、RF均为阴性。将SS患者与对照者一一对应分为3组。Ficoll密度梯度离心法提取外周血单个核细胞,Trizol(Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA)一步法提取细胞中的总RNA。

2. 人全基因组表达谱芯片(寡核苷酸芯片):人全基因组表达谱芯片由北京博奥生物公司提供,芯片包含21522条寡核苷酸探针,每条探针代表了人的一个基因转录本,这些探针点制在一张75mm×25mm、经过化学修饰的氨基基片上。芯片上还包含人的4个看家基因作为阳性对照、阴性对照和外标探针。人类全基因组芯片来自生物芯片北京国家研究中心。

3. 寡核苷酸基因芯片分析:以总RNA为起始材料,含有T7启动子序列的T7 Oligo(dT) Primer为引物,使用CbcScript酶(CapitalBio公司)合成第1链cDNA。用RNase H将杂合链中的RNA切成短片段,DNA聚合酶合成第2链cDNA。然后采用双链DNA为模板,利用T7 RNA聚合酶进行体外转录合成cRNA。取2 μ g cRNA,用CbcScript II酶,随机引物进行反转录,反转录产物以用KLENOW酶进行标记,掺入Cy5-

dCTP、Cy3-dCTP荧光素(GE Healthcare)分别标记3组pSS患者和对照者标本的产物,标记产物用PCR NucleoSpin Extract II Kit(MN)纯化,纯化后抽干。标记的DNA溶于80 μ l杂交液中(3×SSC, 0.2% SDS, 5×Denhart's, 25%甲酰胺),于42℃杂交过夜。杂交芯片清洗后,用LuxScan 10K-A双通道激光扫描仪(CapitalBio公司)进行扫描。

4. 芯片图像的采集与数据分析:采用LuxScan 3.0图像分析软件(CapitalBio公司)对芯片图像进行分析,把图像信号转化为数字信号;差异表达基因筛选:单张芯片以1.5倍筛选差异表达基因。pSS患者和对照者一一对应分为3组,每个基因有3个重复比率(ratio)值,可用芯片分析软件SAM(significance analysis of microarrays)软件进行分析。

5. 统计学处理:本研究不适合常用的t检验等统计学方法,因此,将pSS患者3例与健康对照者3例,一一对应分为3组。我们把3组SAM软件分析得到的差异表达基因在MAS系统(<http://www.capitalbio.com>)中进行了途径(pathway)和统计归类(gene ontology, GO)的统计学分析。P值为错误否定无效假设 $H_0: P_0 = P_1$ 的概率值,反映此途径在实验结果中的重要性。设定 $P < 0.01$ 提示具有统计学差异,q值提示假阳性的概率。P值是通过以下超几何分布的概率公式来计算

$$P = 1 - \sum_{i=0}^{m-1} \frac{\binom{M}{i} \binom{N-M}{n-i}}{\binom{N}{n}}$$

的: $P = 1 - \sum_{i=0}^{m-1} \frac{\binom{M}{i} \binom{N-M}{n-i}}{\binom{N}{n}}$ 。其中N为芯片中具有途径

信息的基因数目,n为N中差异表达的基因数目,M为芯片中具有某特定途径的基因的数目,m为特定途径中差异表达基因的数目, $P_0 = m/M$, $P_1 = n/N$ 。

结 果

1. 干燥综合征患者的基因途径和差异表达基因分析:本次研究旨在从途径视角分析SS患者不同途径的基因表达情况。从这次研究结果看,多个途径的基因差异表达在干燥综合征组与正常对照组之间有统计学意义,其中包括细胞因子途径相关基因、Jak-Stat信号途径相关基因以及神经激活受体配体途径相关基因途径(表1)。以上途径中基因PF4、GZMA表达下调,基因IL-2RA、IL-10表达上调。

表1 干燥综合征患者的基因途径和差异表达基因分析

基因途径	P	q	基因	比率1	比率2	比率3	实验值*	意义
细胞因子及其受体途径	<0.01	<0.01	PF4	0.39	0.55	0.69	-0.88	下调
			IL-2RA	0.98	0.94	1.21	0.07	上调
			IL-10	0.88	1.66	0.77	0.14	上调
Jak-Stat 信号途径	<0.01	<0.01	IL-2RA	0.98	0.94	1.21	0.07	上调
			IL-10	0.88	1.66	0.77	0.14	上调
神经激活配体受体途径	<0.01	<0.01	GZMA	1.06	0.46	0.46	-0.72	下调

* 实验值为3组SS患者与对照者比率(ratio)值代入MAS软件系统得出的值

2. 干燥综合征的差异表达基因的统计归类(GO)分析:将3组干燥综合征患者组及正常对照者组的所

有差异表达基因输入MAS系统gene ontology(GO)数据库,得到差异基因的GO统计学分析结果,即统计

学归类图,干燥综合征患者的差异表达基因功能上涉及细胞构成、分子功能、生理过程领域的基因。

讨 论

IL-2RA,又叫 CD25,是原炎症细胞因子 IL-2 的受体,可溶性的 IL-2RA 分子在自身免疫病患者血清中轻微升高,认为可溶性 IL-2RA 可以作为免疫激活的生物学标志^[3]。本研究发现 SS 患者外周血 IL-2RA 基因表达轻微上调,这与文献相符。这可能因为 IL-2RA 在功能上抑制 IL-2 的相关信号传导,从而改善 SS 免疫炎症反应。可见可溶性 IL-2RA 有助于维持自身免疫耐受的稳定,阻止自身免疫反应过程。IL-10 抑制 Th1、Th2 细胞分泌的细胞因子,并刺激 B 细胞分化,目前认为 IL-10 在免疫反应中起双重作用,一方面使机体免疫活性下调,一方面使 B 淋巴细胞反应下降。

R. Bertorello 证实干燥综合征患者唾液中 IL-10 水平升高。动物模型中,IL-10 发挥了抗炎活性,拮抗共刺激分子表达及原炎症细胞因子释放,抑制抗原递呈细胞的成熟。同时,文献证实 SS 患者外周血分泌 IL-10 水平升高,IL-10 促使 B 细胞被激活并分泌自身抗体^[4,5]。SS 患者唾液腺组织表达 IL-10 水平也是升高的^[6,7]。本研究提示 IL-10 的基因水平表达上调,与文献相符,提示 IL-10 在干燥综合征的发病中有重要意义。文献证实 SS 患者外周血 T 细胞表达 IL-10、IL-2RA 均升高^[8],与本研究结果一致,提示 Jak-Stat 信号途径的这两个基因在 SS 发病机制中起重要作用。

PF4 基因定位在 4 号染色体长臂。PF4 即血小板因子 4 参与多种生物过程,如免疫反应、白细胞的趋化、血小板的激活、巨核细胞分化的负向调节及参与造血组织发育、中和肝素抗凝作用等。结合本次研究的 SS 患者外周血白细胞和血小板均有不同程度的降低,这也是 SS 常见的临床表现,同时检测结果显示 SS 患者外周血单个核细胞的 PF4 基因表达下降,很可能导致 PF4 保护 SS 患者的造血干细胞功能变弱使其外周血有形成分降低。

GZMA 分子即颗粒酶 A,是一种细胞溶解酶,可使靶细胞的核酸降解,学者们发现 SS 患者唾液腺活检 GZMA 水平升高^[9],而本研究提示 SS 患者基因 GZMA 表达是下降的,很可能表达 GZMA 的 CD4⁺T 细胞被趋化到唾液腺中,从而外周血 GZMA 表达水

平降低了。临床上常用的药物环孢素 A 就是通过抑制 GZMA 起效的。研究发现通过给 SS 动物模型 NOD 小鼠喂 K-13182(一种抑制血管细胞黏附分子 VCAM-1 药物),发现 GZMA 表达受到抑制^[10]。

综上所述,细胞因子途径相关基因 PF4、Jak-Stat 信号途径相关基因 IL-2RA、IL-10 以及神经激活受体配体途径相关基因 GZMA 表达的异常在 SS 发病中起一定作用,可见 SS 的发病可能由多基因异常表达共同导致的,推测影响这些基因表达的药物可能成为 SS 新的靶向治疗药物。

参考文献

- 1 Rozman B, Novljan MP, Hocevar A, *et al.* Epidemiology and diagnostics of primary Sjogren's syndrome. *Reumatizam*, 2004, 51 (2): 9-12
- 2 Fox R, Kang H, Pisa E. Cytokine transcription in salivary gland biopsies of Sjogren's syndrome. *J Immunol*, 1994, 151(2): 132-142
- 3 Lisa M. Maier, David E. Anderson, Christopher A. Severson, *et al.* Soluble IL-2RA levels in multiple sclerosis subjects and the effect of soluble IL-2RA on immune response. *The Journal of Immunology*, 2009, 182(3): 1541-1547
- 4 R. Bertorello, M. P. Cordone, P. Contini. P, *et al.* Increased levels of interleukin-10 in saliva of sjogren's syndrome patients. Correlation with disease activity. *Clin Exp Med*, 2004, 4(3): 148-151
- 5 A-K. Halse, P. Tengner, M. Wahren-Herlenius, *et al.* Increased frequency of cells secreting interleukin-6 and interleukin-10 in peripheral blood of patients with primary sjogren's syndrome. *Scand J Immunol*, 1999, 49(5): 533-538
- 6 Fox R, Kang H, Ando D, *et al.* Cytokine mRNA expression in salivary gland biopsies of Sjogren's syndrome. *J Immunol*, 1994, 152(3): 5532-5539
- 7 Ohyama Y, Nakamura S, Matsuzaki G, *et al.* Cytokine messenger RNA expression in the labial salivary glands of patients with sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 1996, 39(8): 1376-1384
- 8 Gilda M. Villarreal, Jorge Alcocer-Varela, Luis Llorente. Differential interleukin 10 and IL-13 gene expression in vivo in salivary glands and peripheral blood mononuclear cells from patients with primary Sjogren's syndrome. *Immunology Letters*, 1996, 49(1): 105-109
- 9 T. Nishiyama, K. Mishima, K. Obara, *et al.* Amelioration of lacrimal gland inflammation by oral administration of K-13182 in sjogren's syndrome model mice. *Clinical and Experimental Immunology*, 2007, 149(3): 586-595
- 10 Alpert S, Kang H, Weissman I, *et al.* Expression of granzyme A in salivary gland biopsies from patients with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 1994, 37(5): 1046-1054

(收稿:2009-10-29)

(修回:2009-11-14)